



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 50 385 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 Q 1/68**

②① Aktenzeichen: 199 50 385.0  
②② Anmeldetag: 19. 10. 1999  
④③ Offenlegungstag: 3. 8. 2000

DE 199 50 385 A 1

BEST AVAILABLE COPY

⑥⑥ Innere Priorität:  
199 03 541. 5      29. 01. 1999

⑦① Anmelder:  
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften e.V., 80539 München, DE

⑦④ Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:  
Grimm, Stefan, Dr., 81241 München, DE; Schubert,  
Alexis, 80796 München, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤④ Verfahren zur Isolation von Apoptose-induzierenden DNA-Sequenzen und Detektionssystem

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen, die in einer Zielzelle eine nicht-selektionierbare Aktivität aufweisen, die Verwendung der identifizierten Gene zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel sowie die Verwendung von sezernierten Enzymen als Reportersystem für Apoptose-Prozesse.

DE 199 50 385 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen, die in einer Zielzelle eine nicht-selektionierbare Aktivität aufweisen, die Verwendung der identifizierten Gene zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel sowie die Verwendung von sezernierten Enzymen als Reportersystem für Apoptose-Prozesse.

Apoptose ist das genetisch kodierte Selbstmordprogramm, welches in eukaryontischen Zellen unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen induziert wird. Die Induktion der Apoptose muß außerordentlich präzise reguliert sein, denn eine Hyperaktivität kann zu degenerativen Erkrankungen führen. Auf der anderen Seite kann eine verringerte Apoptose-Induktion zur Tumorphprogression beitragen.

Verschiedene niedermolekulare Induktoren der Apoptose wurden bereits beschrieben. Eine wichtige Klasse sind Tumorstatische. Auf welche Weise diese Cytostatika oder andere Substanzen Apoptose induzieren können, ist in den meisten Fällen jedoch unbekannt.

Die Identifizierung von Apoptose-induzierenden Genen oder anderen dominanten Genen mit einer nicht-selektionierbaren Aktivität ist problematisch, da eine stabile rekombinante Expression solcher Gene in einer Zielzelle entweder gar nicht oder nur sehr schwer möglich ist. Daher ist es erforderlich, spezielle Screening-Verfahren zur Identifizierung solcher Gene zu verwenden. Hierzu wurden bereits verschiedene in vitro Verfahren entwickelt (King et al., Science 277 (1997), 973-974 und Lustig et al., Meth. Enzymol. 283 (1997), 83-99). Von anderen Arbeitsgruppen wurden transgene Mäuse erzeugt, die multiple Transgene enthalten, deren Funktionen durch Untersuchung des Phänotyps bestimmt wird (Simonet et al., Cell 89 (1997), 309-319 und Smith et al., Nat. Genet. 16 (1997), 28-36). Ein Nachteil bei den in vitro Verfahren besteht darin, daß die erhaltenen Ergebnisse nicht ohne weiteres mit komplex regulierten zellbiologischen Effekten korrelieren. Untersuchungen an transgenen Tieren wiederum sind sehr aufwendig und mühsam.

Grimm und Leder (J. Exp. Med. 185 (1997), 1137-1142) beschreiben ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung dominanter Apoptose-induzierender Nukleinsäuresequenzen. Hierbei werden kleine Plasmidpools entsprechend 20 Klonen aus normalisierten cDNA-Expressionsbibliotheken in die humane Nierenzelllinie 293 transient eingeführt. Die Apoptose-induzierende Aktivität einer Nukleinsäuresequenz wird manuell durch mikroskopische Inspektion auf für Apoptose charakteristische morphologische Merkmale bestimmt. Ein Reporterplasmid wird zur Identifizierung von Apoptose-induzierenden Nukleinsäuresequenzen nicht verwendet. Dieses Verfahren ist aufwendig, kann aufgrund der Notwendigkeit, die Apoptose-induzierende Aktivität durch mikroskopische Inspektion morphologischer Charakteristika zu bestimmen, nur schwer automatisiert werden und ist daher für Reihenuntersuchungen ungeeignet. Weiterhin ist das Verfahren auf besonders effizient transfizierbare Zelllinien beschränkt.

DE-OS 43 42 769 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung und Klonierung von für ein RNA-bindendes Protein kodierender cDNA durch Herstellung einer cDNA-Genbank von einer Zelllinie, welche das RNA-bindende Protein voraussichtlich enthält, Einligieren der Genbank in Expressionsvektoren und deren Expression in Zellen, die bereits einen weiteren Expressionsvektor enthalten, der ein Markergen und in der 5'-nichttranslatierten Region dieses Gens die Bindungsstelle des betreffenden RNA-bindenden Proteins auf-

weist, und Nachweisen der Anwesenheit der cDNA über eine Verminderung der Expression des Markergens. Mit diesem Verfahren können jedoch keine dominanten Gene mit einer nicht-selektionierbaren Aktivität, deren stabile rekombinante Expression in einer Zelle nicht möglich ist, identifiziert werden.

DE-OS 38 06 617 beschreibt ein Verfahren zur Expression von nicht-selektionierbaren Genen in eukaryontischen Zellen, wobei zwei oder mehr Selektionsmarkergene mit den nicht-selektionierbaren Genen transfiziert werden, wobei sich die Selektionsmarkergene und die nicht-selektionierbaren Gene auf einem oder mehreren Vektoren oder DNA-Strukturen befinden und anschließend auf alle transfizierten Selektionsmarker selektioniert wird. Auch mit diesem Verfahren können keine dominanten Gene mit einer nicht-selektionierbaren Aktivität identifiziert werden, deren stabile rekombinante Expression in einer Zelle nicht möglich ist.

WO 91/19796 betrifft ein Verfahren zur Gewinnung einer tierischen oder pflanzlichen Zelle, die eine nicht-selektionierbare Gensequenz inseriert innerhalb einer vorbestimmten Gensequenz des Zellgenoms enthält, mittels homologer Rekombination. Auch dieses Verfahren ist nicht zur Identifizierung von dominanten nicht-selektionierbaren Genen mittels Reihenuntersuchungen geeignet.

WO 91/00361 betrifft ein Verfahren zur identifizierbaren Expression eines nicht-selektionierbaren Gens unter Verwendung eines dominant-selektionierbaren Multidrug-Resistenzgens MDR1, wobei durch Selektion auf das MDR1 Gen eine Amplifikation und Überexpression des nicht-selektionierbaren Gens erfolgt. Auch dieses Verfahren ist zur Identifizierung von dominant nicht-selektionierbaren Genen grundsätzlich ungeeignet.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein neues Verfahren zur Identifizierung von dominanten Nukleinsäuresequenzen mit einer nicht-selektionierbaren Aktivität und dafür geeignete Reporter- bzw. Detektionssysteme bereitzustellen, mit denen die oben geschilderten Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt werden.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von dominanten Aktivitäten von Nukleinsäuresequenzen, das einfach und in intakten Zellen durchführbar ist und automatisiert werden kann. Dabei wird eine Bibliothek von Nukleinsäuresequenzen in vorzugsweise eukaryontische Expressionsvektoren kloniert und von dieser Bibliothek werden einzelne Klone oder kleine Pools von Klonen in Bakterien vermehrt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt vorzugsweise über ein automatisiertes Protokoll, das im 96-Loch-Format durchgeführt werden kann. Die isolierten Plasmid-DNAs können hierzu jeweils zusammen mit einem Reportervektor durch einzelne Transfektionsansätze in eukaryontische Zellen eingebracht werden. Dadurch handelt es sich bei dem hier beschriebenen Vorgehen um eine Reihenuntersuchung, einen sogenannten "Screen". Anschließend wird in den transfizierten eukaryontischen Zellen die Aktivität des Reportervektors bestimmt und mit der Aktivität der Nukleinsäuresequenz korreliert. Da in einer bevorzugten Version des Screens nach Transfektion der Zielzellen immer noch Plasmid-DNA aus den jeweiligen Ansätzen zurückbehalten wird, muß diese nicht aus den Zielzellen isoliert werden. Dies ist bei der Apoptose-Induktion von Vorteil, da bei diesem Vorgang die DNA in den Zellen abgebaut wird. Die Schritte der DNA-Isolierung, Transfektion und Aktivitätsdetektion lassen sich auf einfache Weise durch Verwendung von Robotern automatisieren.

Weiterhin werden neue Detektionssysteme bereitgestellt, welche die Identifizierung von Genen mit nicht-selektionier-

barer Aktivität erleichtern. Diese Detektionssysteme umfassen die Verwendung von sezernierten Enzymen, insbesondere der Sezernierten Alkalischen Phosphatase (SEAP), die vorzugsweise als Reportervektor in die zu untersuchende Zelle eingeführt und deren Sekretion als Maß der zu untersuchenden nicht-selektionierbaren Aktivität dienen kann. Ein Vorteil der Verwendung sezernierter Enzyme besteht darin, daß die Zelle nicht zerstört werden muß, um die Aktivität zu bestimmen. Die Aktivität kann daher im Überstand mehrmals gemessen werden: kurz nach der Transfektion, wenn die Wirkung der zu untersuchenden, in die Zelle eingeführten Nukleinsäuresequenz, beispielsweise die Apoptose-Induktion noch nicht eingesetzt hat, um einen Basiswert zu bestimmen, und zu einem späteren Zeitpunkt, um die Veränderung der enzymatischen Aktivität aufgrund der in der Zelle exprimierten Nukleinsäuresequenz zu messen. Beispielsweise wird in apoptotischen Zellen die Sekretion von Proteinen vermindert, so daß im Gegensatz zu Kontrollzellen die Aktivität des Reporterenzym nicht ansteigt.

Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen, die in einer Zielzelle eine nicht-selektionierbare Aktivität aufweisen, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer DNA-Bibliothek umfassend eine Vielzahl von Wirtszellen, die jeweils eine zu untersuchende Nukleinsäuresequenz auf einem Expressionsvektor in operativer Verknüpfung mit einer in der Zielzelle aktiven Expressionskontrollsequenz enthalten,
- (b) Kultivieren von Wirtszellen,
- (c) Gewinnen des Expressionsvektors aus den kultivierten Wirtszellen,
- (d1) Cotransfizieren von Zielzellen mit
  - (i) dem in Schritt (c) gewonnen Expressionsvektor und
  - (ii) einem Reportervektor, oder
- (d2) Transfizieren von bereits einen Reportervektor enthaltenden Zielzellen mit dem in Schritt (c) gewonnenen Expressionsvektor und
- (e) Bestimmen der Aktivität des Reportervektors in den Zielzellen oder in deren Kulturüberbestand als qualitatives oder quantitatives Maß für die zu nicht-selektionierbare Aktivität der untersuchten Nukleinsäuresequenz.

Die zu untersuchenden Nukleinsäuresequenzen können grundsätzlich aus beliebigen Quellen stammen, z. B. aus Eukaryonten wie Pflanzen, Wirbeltieren z. B. Säugern, Pilzen, Parasiten etc., aber auch aus Bakterien, Archeae oder Viren oder aus synthetischen oder semisynthetischen Quellen. Sie werden beispielsweise aus genomischen Sequenzen beliebiger Herkunft, cDNA-Sequenzen, cDNA-Fragmenten oder Teilsequenzen oder auch aus synthetisch erzeugten Sequenzen wie etwa Antisense-Molekülen oder kombinatorisch modifizierten Nukleinsäuresequenzen ausgewählt.

Ziel des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, Nukleinsäuresequenzen zu identifizieren, die in einer Zielzelle eine nicht-selektionierbare Aktivität aufweisen, d. h. die nicht stabil in einer Zielzelle rekombinant (über)exprimiert werden können, beispielsweise weil sie das Wachstum der Zelle hemmen oder den Zelltod, z. B. durch Apoptose, herbeiführen. Beispiele solcher nicht-selektionierbarer Aktivitäten sind etwa die Apoptose-Induktion, die Zellzyklus-Arretierung, die Zelldifferenzierung, die Inhibition des Zellstoffwechsels und die Inhibition der Expression von Genen, z. B. durch Transkriptionsfaktoren. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung

von dominanten Apoptose-Induktionsgenen verwendet.

Schritt (a) des Verfahrens besteht darin, eine DNA-Bibliothek bereitzustellen, umfassend eine Vielzahl von Wirtszellen, die jeweils eine zu untersuchende Nukleinsäuresequenz enthalten. Diese DNA-Bibliothek ist vorzugsweise – insbesondere wenn es sich um eine cDNA-Bibliothek handelt – eine normalisierte Bibliothek, d. h. eine Bibliothek, die an abundanten Spezies abgereichert ist. Die Herstellung solcher normalisierten Bibliotheken wurde von Sasaki et al. (Nucleic Acids Res. 22 (1994), 9987–9992) beschrieben. Die Abreicherung abundanter Spezies in einer Population von mRNA-Molekülen wird durch Zugabe von beispielsweise auf Latexbeads immobilisierten cDNA Molekülen, gegebenenfalls in mehreren Hybridisierungsrounds erreicht.

Die Nukleinsäurebibliothek wird in einem Expressionsvektor angelegt, der in der jeweils gewünschten Zielzelle, vorzugsweise einer eukaryontischen Zelle und insbesondere einer Säugerzelle aktiv ist, d. h. die zu untersuchende Nukleinsäure steht auf dem Expressionsvektor in operativer Verknüpfung mit einer in der Zielzelle konstitutiv oder regulierbar aktiven Expressionskontrollsequenz. Weiterhin enthält der Expressionsvektor Elemente, welche eine Replikation und Selektion in der Wirtszelle ermöglichen, d. h. einen entsprechenden Replikationsursprung und ein Selektionsmarkergen, z. B. ein Antibiotikaresistenzgen. Da eine Selektion des Expressionsvektors in der Zielzelle nicht durchgeführt werden kann, ist das Vorhandensein von Elementen, die eine Replikation und Selektion in der Zielzelle erlauben, nicht notwendig. Da als Wirtszellen vorzugsweise Bakterienzellen, insbesondere gramnegative Bakterien und besonders bevorzugt E.coli Zellen verwendet werden, kann der Expressionsvektor ein Shuttle-Vektor sein, der sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Sequenzelemente enthält.

Der Expressionsvektor ist zweckmäßigerweise ein extrachromosomaler Vektor und insbesondere ein transient transifizierbares Plasmid. Alternativ kann jedoch auch ein stabiler episomaler Expressionsvektor eingesetzt werden. Derartige Expressionsvektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt und beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder in anderen Standardlehrbüchern beschrieben.

Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt eine Kultivierung von Wirtszellen. Vorzugsweise werden einzelne Wirtszellen als Ausgangsmaterial zur Kultivierung verwendet. Solche einzelnen Wirtszellen können beispielsweise durch Ausplattieren von Klonen der Nukleinsäurebibliothek auf festen Kulturplatten oder entsprechende Verdünnung flüssiger Kulturmedien erhalten werden. Gegebenenfalls können auch mehrere Wirtszellen, z. B. kleine Pools von maximal bis zu 20 verschiedenen Klonen, insbesondere von maximal bis zu 10 verschiedenen Klonen pro Transfektionsansatz gemeinsam kultiviert werden, obwohl dies in den meisten Fällen weniger bevorzugt ist.

Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens beinhaltet das Gewinnen des Expressionsvektors aus den kultivierten Zellen. Hierzu können aus dem Stand der Technik bekannte Methoden zur Isolierung extrachromosomaler DNA (siehe z. B. Sambrook et al., supra) eingesetzt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die aus der Wirtszelle isolierte DNA eine ausreichende Reinheit aufweisen sollte, um die spätere Cotransfektion der Zielzelle mit hoher Effizienz zu ermöglichen.

Bei bakteriellen Wirtszellen wird vorzugsweise eine alkalische Lyse durchgeführt. Die Qualität der erhaltenen Plasmid-DNA kann durch Adsorption an eine feste Matrix, ins-

5 besondere eine Silika-Adsorptionsmatrix, Waschen mit organischen Lösungsmitteln und anschließende Elution verbessert werden. Überraschenderweise wurde dabei gefunden, daß die DNA nach der alkalischen Lyse ohne daß – wie im Stand der Technik beschrieben – die Zugabe chaotroper Substanzen erforderlich ist, mit hoher Effizienz an die Adsorptionsmatrix gebunden werden kann. Die Abwesenheit zugesetzter chaotroper Substanzen führt zur erheblichen Verbesserungen und Vereinfachungen bei der anschließenden Aufreinigungsprozedur und stellt daher – unabhängig von den vorhergehenden und nachfolgenden Schritten des beanspruchten Verfahrens – einen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung dar.

Schritt (d) beinhaltet eine Transfektion oder Cotransfektion von Zielzellen, insbesondere eukaryontische Zellen wie etwa Säugerzellen, mit dem zuvor isolierten Expressionsvektor und gegebenenfalls einem Reportervektor. Bei eukaryontischen Zielzellen erfolgt die Transfektion bzw. Cotransfektion vorzugsweise durch Calciumphosphat-Coprecipitation, Lipofektion, Elektroporation, Partikelbeschuß oder virale Infektion (Retroviren, Adenoviren etc.). In den durch Transfektion oder Cotransfektion erzeugten Zielzellen kann der Expressionsvektortransient, der Reportervektortransient oder stabil exprimiert werden. Eine transiente Expression ist bevorzugt.

Bei der bevorzugten Cotransfektion wird der Expressionsvektor günstigerweise in einem molaren Überschuß bezüglich des Reportervektors eingesetzt. Besonders bevorzugt beträgt das Molverhältnis zwischen Reportervektor und Expressionsvektor 1 : 2 bis 1 : 20. Bei Verwendung des Expressionsvektors im molaren Überschuß kann die Anwesenheit des Reportervektors in der Zielzelle als Marker für das gleichzeitige Vorhandensein des Expressionsvektors in der Zielzelle dienen, da Zellen bei einer Cotransfektion die eingesetzten Plasmide entsprechend ihrem Molverhältnis im Cotransfektionsansatz aufnehmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt im übrigen auch die Verwendung mehrerer Reportervektoren, von denen einer bereits (chromosomal oder extrachromosomal) in der Zielzelle vorliegt und ein anderer mittels Cotransfektion zusammen mit dem Expressionsvektor in die Zelle eingeführt wird.

Der Reportervektor wird vorzugsweise so gewählt, daß kein unmittelbarer funktioneller Zusammenhang zwischen Reporter- und Expressionsvektor besteht, d. h. daß ein von dem Expressionsvektor kodiertes Genprodukt nicht direkt auf die Aktivität des Reportervektors wirkt, sondern daß ein vom Expressionsvektor kodiertes Genprodukt nur mittelbar, d. h. über eine Beeinflussung des Metabolismus der Zielzelle auf die Aktivität des Reportervektors wirkt. Es sind jedoch auch Ausführungsformen des Screens möglich, welche eine Detektion von direkten Interaktionen zwischen Reportervektor und Expressionsvektor erlauben.

Der zusammen mit dem Expressionsvektor cotransfizierte oder bereits in der Zielzelle vorhandene Reportervektor enthält im allgemeinen eine für ein nachweisbares Genprodukt kodierende Nukleinsäuresequenz in einer in der Zielzelle exprimierbaren Form. Der Reportervektor ist vorzugsweise ein extrachromosomaler Vektor, besonders bevorzugt ein transient transfizierbares Plasmid. Andererseits kann auch ein stabiler epismomaler oder chromosomaler Reportervektor eingesetzt werden. In diesem Fall enthält der Reportervektor Elemente, die eine Selektion und gegebenenfalls eine Replikation in den Zielzellen ermöglichen. Die Expression des nachweisbaren Genprodukts kann über eine konstitutive oder regulierbare Expressionskontrollsequenz, vorzugsweise über eine konstitutive Expressionskontrollsequenz erfolgen.

Das vom Reportervektor kodierte Genprodukt ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein sezerniertes Enzym, d. h. ein Enzym, welches von der Zielzelle sekretiert wird. Beispiele für solche Enzyme sind die sezernierte Alkalische Phosphatase (SEAP) (Berger et al., Gene 66 (1988), 1–10)) sowie die Luziferase (Lui et al., Gene 202 (1977), 141–148). Besonders bevorzugt wird die SEAP als sezerniertes Enzym verwendet. Bei Verwendung sezernierter Genprodukte als Reportersystem erfolgt die Bestimmung der Aktivität im Kulturüberstand der Zielzellen. Andererseits kann das vom Reportervektor kodierte nachweisbare Genprodukt auch ein nicht-sekretiertes Polypeptid sein, welches intrazellulär in einer intakten Zelle nachweisbar ist, beispielsweise ein Fluoreszenzprotein wie GFP. Ebenso kann das vom Reportervektor exprimierte nachweisbare Genprodukt auch ein membranständiges, z. B. durch Inkubation mit Antikörpern oder Affinitätsliganden nachweisbares Polypeptid sein.

Schritt (e) des erfindungsgemäßen Verfahrens beinhaltet die Bestimmung der Aktivität des Reportervektors in den Zielzellen oder in deren Kulturüberstand als Maß für die nicht-selektionierbare Aktivität der untersuchten Nukleinsäuresequenz. Diese Bestimmungsmethode beruht darauf, daß die auf dem Expressionsvektor befindliche zu untersuchende Nukleinsäuresequenz in der Zielzelle nach Expression einen Einfluß auf den Zellmetabolismus, z. B. durch Apoptose-Induktion, aufweist, der wiederum die Aktivität des Reportervektors bzw. des von ihm kodierten nachweisbaren Genprodukts auf meßbare Weise beeinflusst. Vorzugsweise wird die Aktivität des Reportervektors an mindestens zwei Punkten nach der Transfektion oder Cotransfektion bestimmt, wobei der erste Zeitpunkt so gewählt wird, daß eine Expression der auf dem Expressionsvektor enthaltenen Nukleinsäuresequenz noch keinen Einfluß auf die Aktivität des Reportervektors hat, und somit dazu dienen kann, eine Basisaktivität für die jeweils untersuchte Zielzelle festzulegen. Der zweite Zeitpunkt wird so gewählt, daß eine Expression der auf dem Expressionsvektor enthaltenen Nukleinsäuresequenz bereits einen meßbaren Einfluß auf die Aktivität des Reportervektors hat – sofern die in der jeweiligen Zelle vorhandene Nukleinsäuresequenz die untersuchte nicht-selektionierbare Aktivität aufweist. Auf diese Weise kann unabhängig von der Basisaktivität des Reportervektors, die von der Transfektionseffizienz bei der Transfektion oder Cotransfektion abhängt, die Aktivität einer in eine bestimmte Zelle eingeführten Nukleinsäuresequenz bestimmt werden. Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird bevorzugt zumindest teilweise automatisiert, wobei die Schritte (b) bis (e) an mindestens 50 Proben jeweils parallel durchgeführt werden können.

Wenn das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen eingesetzt wird, die einen Einfluß auf sekretorische Eigenschaften der Zielzelle haben wie etwa die Apoptose-Induktion, ist die Messung der Aktivität des Reportervektors im Zellüberstand zur Identifizierung der gewünschten Nukleinsäuresequenzen ausreichend. In anderen Ausführungsformen des Verfahrens, z. B. bei der Identifizierung von die Zelldifferenzierung beeinflussenden Substanzen, kann das vom Reportervektor kodierte nachweisbare Genprodukt, z. B. ein Fluoreszenzprotein wie GFP, intrazellulär zur Markierung der transfizierten Zellen exprimiert werden. Diese Markierung kann gegebenenfalls mit der Detektion zusätzlicher zellulärer Parameter, z. B. Detektion von Oberflächenmarkern mit Antikörpern oder Rezeptorliganden, kombiniert werden. Zur Detektion dieser zusätzlichen Parameter können fluoreszierende Reagenzien eingesetzt werden. Das Vorhandensein oder/und die Intensität der Markierung(en) auf den Zellen können dann durch

Fluoreszenzcytometrie, z. B. mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting) bestimmt werden.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren identifizierten Gene können zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel eingesetzt werden. So können bei Durchführung des Verfahrens unterschiedliche Zielzellen (normale Zellen, Tumorzellen) verwendet werden. Es können auch Zellen mit definierten genetischen Veränderungen wie z. B. Zellen mit aktivierten Onkogenen oder inaktivierten Tumorsuppressorgenen, sowie Virus-infizierte Zellen für den Screen benutzt werden. Dadurch können Nukleinsäuresequenzen identifiziert bzw. isoliert werden, welche ihre Aktivität selektiv in bestimmten Zelltypen aufweisen, z. B. Gene die eine selektive Apoptose-Induktion in Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen herbeiführen. Diese Gene könnten dann beispielsweise zur gentherapeutischen Bekämpfung von Tumorerkrankungen oder Virusinfektionen im Körper von Patienten exprimiert werden. Da für die Apoptose-Induktion nur eine transiente Aktivität notwendig ist, wird die derzeit noch schwierige permanente Expression bei der Gentherapie umgangen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von sezernierten Enzymen als Reportersystem für Apoptose-Prozesse, beispielsweise zur Identifizierung von Apoptose-assoziierten Genen oder zur Identifizierung von die Apoptose beeinflussenden Arzneimitteln. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Reportersystem zur Identifizierung von Apoptose-Induktions- oder Apoptose-Inhibitions-Genen.

Besonders bevorzugt wird die Sezernierte Alkalische Phosphatase (SEAP) als Reportersystem eingesetzt. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgt günstigerweise unter Verwendung von chromogenen oder auch fluoreszierenden Substraten für das jeweilige Enzym. Derartige Enzymsubstrate sind bekannt. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Reportersystem in einem zuvor beschriebenen Verfahren.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Vorrichtung zur automatisierten Durchführung des zuvor beschriebenen Verfahrens. Diese Vorrichtung enthält bevorzugt zwei Roboter: einen für die Isolation der Plasmid DNA aus den Wirtszellen und einen für die Transfektion von Zielzellen (Fig. 4 und 5). Der DNA Isolationsroboter umfaßt Mittel zur Kultivierung einer Vielzahl von Wirtszellen, beispielsweise einen Block oder eine Mikrotiterplatte. Die Kulturvolumina für die Wirtszellen liegen vorzugsweise im Bereich von 0,5–2,5 ml, besonders bevorzugt im Bereich von 0,5 bis 1 ml. Weiterhin umfaßt die Vorrichtung Mittel zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus einer Vielzahl von Wirtszellen, bei denen es sich beispielsweise um Mikrotiterplatten oder Blöcke handelt, die gegebenenfalls Minisäulen zur Aufreinigung der Plasmid-DNA enthalten können. Der Transfektionsroboter enthält Mittel zur Transfektion und Kultivierung einer Vielzahl von Zielzellen, bei denen es sich ebenfalls um Blöcke oder Mikrotiterplatten handeln kann. Schließlich enthält die Vorrichtung Mittel zur Bestimmung der Aktivität eines Reportervektors in Zielzellen, vorzugsweise ein spektrophotometrisches Meßgerät oder ein Fluoreszenzmeßgerät. Beide Roboter arbeiten mit Mehrkanalpipetten, wobei die jeweiligen Flüssigkeiten gleichzeitig pipettiert werden können, um einen entsprechenden Probendurchsatz zu erreichen.

Eine Vielzahl von möglichen Roboterausführungen ist möglich, um den Screen durchzuführen. Gezeigt sind in Fig. 4 und 5 zwei bevorzugte Ausführungsformen, bei denen die behandelten Platten mit den DNA Proben und den Wirtszellen bzw. die DNA-Proben und die Zielzellen auf einer Fläche ausgelegt werden und durch einen Pipettierkopf, der in

x,y,z-Richtung beweglich ist, miteinander verbunden sind.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgend beschriebenen Figuren und Beispiele näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die schematische Darstellung eines Screening-Verfahrens auf dominante nicht-selektierbare Nukleinsäureaktivitäten in einem 96-Loch-Format,

Fig. 2 die Bindekapazität von DNA nach alkalischer Lyse von Bakterienzellen an Siliciumdioxid abhängig von der Konzentration an Guanidiniumhydrochlorid,

Fig. 3 die Messung von SEAP-Aktivitäten zum Nachweis dominanter Apoptose-induzierender Gene:

A: Zeitverlauf der SEAP-Aktivität in Cotransfektionsexperimenten unter Verwendung eines SEAP-Expressionsvektors und eines Kontrollvektors (Kreis), eines für das Zellzyklus-Arretierungsgen p21 kodierenden Expressionsvektors (Quadrat) und eines Apoptose-induzierenden Gens (Raute). Die Daten sind bezüglich der Aktivität bei 16 h nach Transfektion normalisiert

B: Verringerung der SEAP Aktivität ( $\Delta A_{405 \text{ nm}}$ ) durch Apoptoseinduktion. Die SEAP-Aktivität 16 h nach Transfektion wurde zur Normalisierung der Aktivität nach 36 h verwendet, deren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten angezeigt sind.

Fig. 4 eine schematische Darstellung des DNA Isolationsroboters. Lagerungsplätze für Blöcke z. B. 96-well Blöcke mit Wirtszellen oder der daraus isolierten DNA und deren Zwischenstufen sind als A, B, C, d bezeichnet. Die für die DNA Gewinnung notwendigen Reagenzien sind zu beiden Seiten angeordnet. P1, P2, P4, SiOx (Siliciumdioxid-Lösung) Acet. (Acetat-Lösung), und H<sub>2</sub>O bezeichnen Reservoir mit entsprechenden Lösungen, die für die DNA-Gewinnung benötigt werden. Eine Waschstation ("washing") wird zum Reinigen der Spritzen des Pipettierkopfes benötigt. Mittel zum Zentrifugieren, ("centrifuge"), zum Anlegen eines Vakuums ("vacuum"), zum Schütteln (shaking) und Inkubationsstationen (inc.) dienen zur Bearbeitung der Platten für die Aufreinigung der DNA. Ein über die gesamte Fläche beweglicher Pipettierkopf mit Greifarm, der durch Antriebe (X, Y, Z) in verschiedene Richtungen bewegt werden kann, verbindet die Platten und die Bearbeitungsstationen untereinander. In der oberen Bildhälfte ist der Roboter in einer Seitenansicht gezeigt.

Fig. 5 eine schematische Darstellung des Transfektionsroboters. Die Zielzellen für die Transfektion sind in vier übereinander angeordneten Reichen in Multiwell-Platten eingezeichnet. Die zu transfizierenden DNA-Proben sind in der obersten Reihe in 96-well Platten angeordnet. In der darunterliegenden Reihe werden die Transfektionsreaktionen angesetzt. Die dazu zusätzlich zur DNA benötigten Reagenzien sind als L1 und L2 bezeichnet. Eine Waschstation, ebenso wie eine Abfallstation (waste) dient der Säuberung der Spritzen des Pipettierkopfes ("Z"), der in X, Y, Z Richtung beweglich ist und durch entsprechende Schrittmotoren (X, Y, Z) angetrieben wird. Am oberen und rechten Bildrand ist eine seitliche Ansicht des Roboters bzw. des beweglichen Pipettierkopfes eingezeichnet.

Fig. 6 eine Darstellung der phänotypischen Veränderung bei der Apoptose-Induktion mit ANT-1 mittels Cotransfektion von GFP. 3 µg Expressionplasmid für ANT-1 oder ein leerer Expressionsvektor wurden in HeLa Zellen transfiziert. Dazu wurde jeweils 1 µg eines Expressionsvektors für GFP ("Green fluorescent protein") cotransfiziert, um die transfizierten Zellen zu markieren. Die Fluoreszenz wurde mit einer 200-fachen Vergrößerung 24 Stunden nach der Transfektion aufgenommen.

## Beispiele

SEAP-Puffer wie beschrieben getestet.

## Beispiel 1

## 1.4 Plasmidisolierung mit Säulen

Isolation von Apoptose-induzierenden Genen durch Co-transfektion eines SEAP-Gens auf einem Markerplasmid

## 1. Experimentelle Protokolle

## 1.1 Zellkultur und Transfektionen

Babyhamster Nierenzellen (BHK) wurden in DMEM ergänzt mit 5% fötalem Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer befeuchteten 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Für Transfektionen wurden die Zellen in 24-Loch-Platten gegeben und mit 2 µg Plasmid DNA nach der Calciumphosphat-Croppräzipitationsmethode wie von Rousset et al. (Mol. Cell. Biol. 4 (1984), 1999–2009) beschrieben transfiziert. Hierfür wurden 25 µl DNA Lösung mit 25 µl 2 × HBS-Puffer pH 6,9 (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 40 mM Hepes, 1,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) bei 4°C in einer 96-Loch-Platte mit einem 12-Kanal-Pipettierautomaten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermischt. Nach Zugabe von 20 µl einer 0,25 M CaCl<sub>2</sub> Lösung (4°C) und Mischen wurden 38 µl nach Inkubation für 25 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben.

## 1.2 Erzeugung einer normalisierten Bibliothek und cDNA Screening

Die Normalisierung und Konstruktion einer Nieren cDNA Bibliothek wurde wie von Grimm und Leder (J. Exp. Meth. 185 (1997), 1137–1142) und Sasaki et al. (Nucleic Acids Res. 22 (1994), 987–992) beschrieben durchgeführt.

mRNA aus der Niere von 4 bis 6 Wochen alten FVB Mäusen wurde durch Assoziation abundanter mRNA Spezies mit kovalent an Latexbeads gekoppelten Antisense-cDNA-Molekülen und anschließende Abtrennung durch Zentrifugation normalisiert. Nach zwei Hybridisierungsrounds wurden 200 ng (von ursprünglich 2 µg) mRNA erhalten und zur Herstellung einer cDNA Bibliothek unter Verwendung eines cDNA Synthesekits (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) verwendet. Nach Ligation eines BstXI Adaptors (Invitrogen, San Diego, CA) und einer Spaltung mit NotI wurden die cDNA Moleküle in einen modifizierten pcDNA3-Vektor (Invitrogen) unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotors inseriert, in dem das Neomycinresistenzgen deletiert worden war. Die DNA wurde durch Elektroporation in E.coli SURE-Zellen (Stratagene, Corp. La Jolla, CA) eingeführt, die anschließend sofort eingefroren wurden.

Durch Ausplattieren von Aliquots des Transformationsansatzes auf Agar wurde gefunden, daß die Bibliothek etwa 2,5 × 10<sup>5</sup> Klone enthielt. Aliquots, die statistisch Einzelklone enthielten, wurden in Löchern von 96-Loch-Blöcken (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 900 µl LB-Medium inokuliert und für 30 h unter Schütteln bei 300 Upm kultiviert. Nach Identifizierung eines positiven Pools wurde die DNA zur Bestätigung des Ergebnisses erneut transfiziert. Die verbleibende DNA wurde zur Transformation von Bakterien für eine Plasmidisolierung im großen Maßstab verwendet.

## 1.3 Bestimmung der Aktivität von Sezernierter Alkalischer Phosphatase (SEAP)

Die SEAP-Aktivität wurde wie von Berger et al. (Gene 66 (1988), 1–10) beschrieben bestimmt. Hierzu wurde der Kulturüberstand bei 4000 Upm zentrifugiert. Nach Hitzebehandlung bei 65°C für 30 min wurde die Aktivität in einem

96-Loch-Blöcke mit Bakterien wurden für 5 min bei 3000 g (Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Blöcke wurden für 2 bis 3 min umgedreht. Dann wurden 170 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl/10 mM EDTA pH 8,0) zugegeben und die Bakterienpellets wurden durch vollständige Vortexbehandlung für 10 bis 20 min resuspendiert. Nach Zugabe von 170 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde der Block mit Folie abgedichtet, durch Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 170 µl von 4°C kaltem Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) beendet. Dann wurden 10 µl RNaseA Lösung (1,7 mg/ml) zugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur und dann bei –20°C inkubiert und erneut für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Blöcke dekantiert und 100 µl Puffer P4 (2,5% SDS in Isopropanol) wurden zugegeben. Der Block wurde einer Vortexbehandlung für 5 min unterzogen und zuerst für 15 min bei 4°C und dann für 15 min bei –20°C inkubiert. Die Blöcke wurden für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand wurde in eine Anordnung von 96 Säulen überführt, die durch Einsetzen von kommerziell erhältlichen Säulen (Qiagen) in entsprechend zugeschnittene 96-Loch-Platten hergestellt worden war. Diese Platten wurden in Vakuumkammern (Qiagen) gestellt. Dann wurden 150 µl Siliciumoxidsuspension zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (die Siliciumoxidsuspension wurde hergestellt durch Zugabe von 150 µl HCl (37%) zu 250 ml einer Suspension von 50 mg/ml SiO<sub>2</sub> (Sigma) und anschließendes Autoklavieren).

Nach Anlegen von Vakuum wurden die Säulen zweimal mit 600 µl Aceton (–20°C) gewaschen. Die 96-Loch-Säulenplatte wurde auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und für 4 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Die Säulenplatte wurde zuerst für 5 min bei 37°C und dann für 5 min in einer Vakuumkammer getrocknet. Dann wurde sie auf eine weitere Mikrotiterplatte gestellt. 70 µl H<sub>2</sub>O (60°C) wurden zugegeben und dann erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 6000 Upm. Die Mikrotiterplatte wurde bei –20°C aufbewahrt.

## 1.5 Plasmidisolierung ohne Säulen

Das Verfahren erfolgte bis zur Zugabe des Puffers P4 wie unter Punkt 1.4 beschrieben. Dann wurde der Überstand nach Zentrifugation für 10 min bei 6000 Upm in 96-Loch-Polyoxymethylen-Mikrotiterblöcke gegeben. 150 µl Siliciumoxidsuspension wurden zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden für 5 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert und 400 µl Aceton (–20°C) wurden zugegeben. Die Platten wurden erneut einer Vortexbehandlung (30 sec) unterzogen und für 3 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Dieser Acetonwaschvorgang wurde einmal wiederholt. Die Platten wurden zuerst bei Raumtemperatur für 5 min und dann für 5 min in einer Vakuumkammer getrocknet. Die Pellets wurden in 75 µl Wasser (60°C) resuspendiert und bei 6000 Upm und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte bei –20°C aufbewahrt.

## 2. Ergebnisse

Die schematische Durchführung des Screeningsverfahrens auf nicht selektierbare Gene in einem 96-Loch-Format

ist in Fig. 1 gezeigt. Dabei wurden Medium enthaltende 96-Loch-Blöcke mit Aliquots einer normalisierten, nicht amplifizierten cDNA-Expressions-Bibliothek inokuliert, die statistisch einzelne Bakterienklone enthalten. Aus diesen Bakterienkulturen wurde Plasmid-DNA unter Verwendung von Minisäulen (siehe Punkt 1.4) isoliert. Ein entsprechendes Protokoll ohne Säulen ist unter Punkt 1.5 beschrieben. Ein Screening in diesem Format ermöglicht es, daß vier Arbeitskräfte eine vollständige normalisierte cDNA Bibliothek, die üblicherweise etwa 250 000 Klone enthält, in etwa 14 Wochen durchmustern.

Für den Transfektionsschritt bei diesem Screeningprozeß ist es wichtig, Plasmid-DNA sehr hoher Reinheit zu erhalten. Hierzu wurde Siliciumdioxid als Bindematrix für Plasmid-DNA verwendet. Die Bindung von DNA an Siliciumdioxid in Anwesenheit chaotroper Substanzen ist bekannt (Vogelstein und Gillespie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 615–619). Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß selbst in Abwesenheit einer zugefügten chaotropen Substanz wie etwa Guaidinhydrochlorid die Plasmid-DNA mit ausreichender Kapazität an Siliciumdioxid bindet (Fig. 2). Nach anschließendem Waschen in Aceton gegebenenfalls unter Zusatz von SDS, konnte Plasmid DNA in hervorragender Qualität – entsprechend einer Reinigung über eine Cäsiumchloridgradienten – erhalten werden. Üblicherweise wurden etwa 10 µg Plasmid-DNA aus 900 µl LB-Medium mit einer OD<sub>260/280</sub> von mehr als 1,8 erhalten, wovon 90% in der supercoiled Form vorlagen.

Das Screening auf Apoptose-induzierende Gene erfolgte durch Bestimmung der Aktivität von der Sezernierten Alkalischen Phosphatase (SEAP) im Zellüberstand. Eine für SEAP kodierende DNA-Sequenz wurde auf einem Reporterplasmid (Flanagan und Leder, Cell 63 (1990), 185–195) unter Kontrolle des konstitutiven Moloney Virus LTR-Promotors zusammen mit dem cDNA-Expressionsvektor in die BHK-Zellen (oder auch andere Zellen wie etwa HeLa-Zellen) durch Cotransfektion eingeführt.

16 h nach Transfektion erfolgte eine erste Messung der SEAP Aktivität. Diese anfängliche Aktivität wurde zur Normalisierung der nachfolgenden Aktivitätsbestimmungen verwendet und als Nullpunkt gesetzt (Fig. 3A). Diese Normalisierung erfolgte zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen.

Bei Cotransfektion mit einem Kontrollvektor konnte eine starke Zunahme der SEAP-Aktivität gefunden werden. Bei Cotransfektion mit einem Vektor, der ein Apoptose-induzierendes Gen enthält, wurde jedoch nur ein sehr geringer Anstieg in der SEAP Aktivität festgestellt (Fig. 3A).

Der Rückgang der SEAP-Aktivität durch Apoptose-Induktion ließ sich durch zweimalige Messung des Kulturüberstands – 16 und 36 h nach Transfektion – reproduzierbar bestimmen. Fig. 3B zeigt, daß die SEAP Aktivität um den Faktor 10 bei Cotransfektion eines Apoptose-induzierenden Gens im Vergleich zu einer Kontrolle verringert wird. Unter Verwendung des beschriebenen Verfahrens konnten bereits mehrere Apoptose-induzierende Gene identifiziert werden.

## Beispiel 2

Isolation von Apoptose-induzierenden Genen durch Cotransfektion eines GFP-Gens auf einem Markerplasmid

Der Screen nach Apoptose-induzierenden Genen wurde auch mittels Cotransfektion eines GFP-Gens zur Markierung der transfizierten Zellen und anschließender Bestimmung der Apoptose durch die Detektion von für Apoptose charakteristischen phänotypischen Veränderungen durchge-

führt. So weisen apoptotische Zellen ein kontrahiertes Cytoplasma und daher ein verringertes Zellvolumen auf.

Hierzu wurden 3 µg eines Expressionsvektors aus der Genbibliothek mit jeweils 1 µg des GFP Vektors (pLantern, Gibco BRL) cotransfiziert. Die transfizierten (und damit fluoreszierenden, da GFP positiven) Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12–48 Stunden nach der Transfektion) unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25 CFL, Zeiss) nach phänotypischen Veränderungen, die durch die Apoptose verursacht werden, untersucht. Dabei wurde nach Zellen gesucht, die eine Reduktion im Zellvolumen aufweisen. Da das GFP-Protein über die ganze Zelle verteilt ist, konnten solche Zellen leicht identifiziert werden. Unter Verwendung geeigneter Computerprogramme und Fluoreszenzkameras läßt sich die Detektion ohne weiteres automatisieren.

Mit dieser Version des Screens wurde das Gen für die Adenosin-Nukleotidtranslokase-1 (ANT-1) isoliert. Fig. 6 zeigt die morphologischen Veränderungen, die durch die Transfektion von ANT-1 in Zellen hervorgerufen werden. Dieses Gen induziert auch andere biochemische Vorgänge, die spezifisch für Apoptose sind, so z. B. den Abbau der DNA, die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und die Aktivierung der Cysteinproteasen der Caspasenfamilie. ANT-1 ist eine Komponente des "Permeability Transition" Komplexes in Mitochondrien, der bekanntermaßen bei der Apoptose-Induktion eine Rolle spielt. Die Isolation dieses Gens ist daher eine Bestätigung, daß der Screen die Isolierung von Genen erlaubt, die bei der Apoptose-Induktion eine Rolle spielen.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen, die in einer Zielzelle eine nicht-selektionierbare Aktivität aufweisen, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer DNA-Bibliothek umfassend eine Vielzahl von Wirtszellen, die jeweils eine zu untersuchende Nukleinsäuresequenz auf einem Expressionsvektor in operativer Verknüpfung mit einer in der Zielzelle aktiven Expressionskontrollsequenz enthalten,
- (b) Kultivieren von Wirtszellen,
- (c) Gewinnen des Expressionsvektors aus den kultivierten Wirtszellen,
- (d1) Cotransfizieren von Zielzellen mit
  - (i) dem in Schritt (c) gewonnenen Expressionsvektor und
  - (ii) einem Reportervektor, oder
- (d2) Transfizieren von bereits einen Reportervektor enthaltenden Zielzellen mit dem in Schritt (c) gewonnenen Expressionsvektor und
- (e) Bestimmen der Aktivität des Reportervektors in den Zielzellen oder in deren Kulturüberstand als qualitatives oder quantitatives Maß für die nicht-selektionierbare Aktivität der untersuchten Nukleinsäuresequenz.

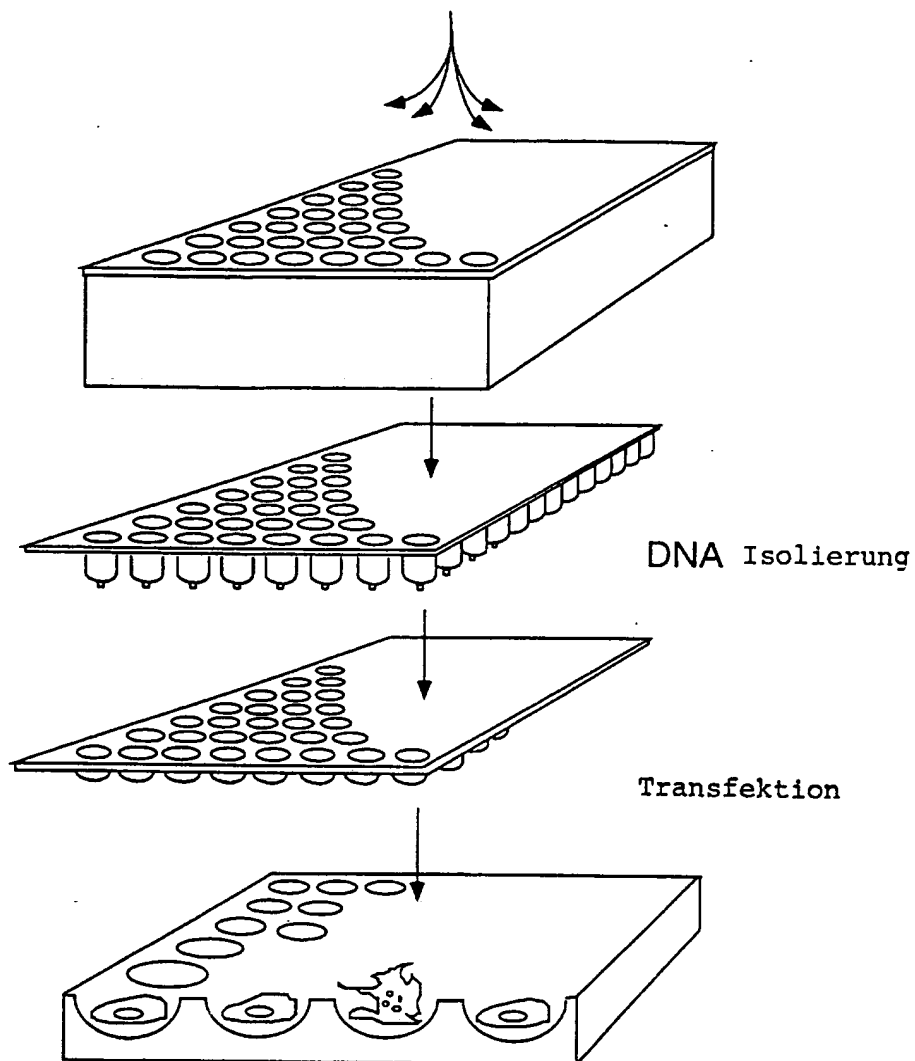
2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenzen aus genomischen Sequenzen beliebiger Herkunft, cDNA-Sequenzen, cDNA-Fragmenten und Antisense-Molekülen ausgewählt werden.

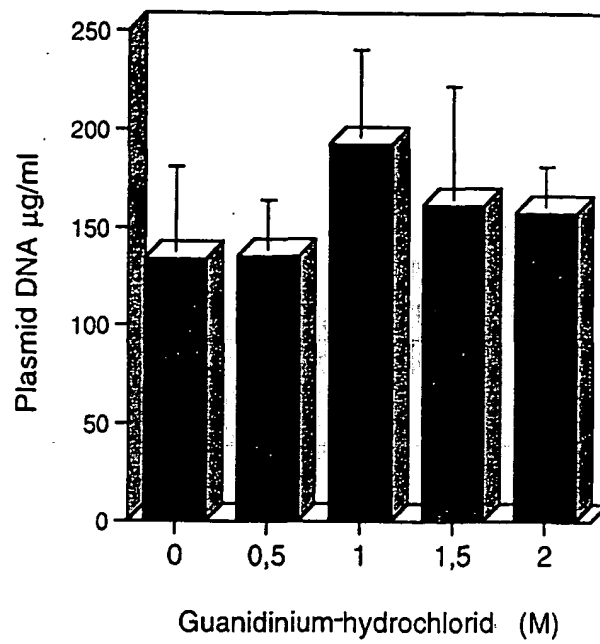
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht-selektionierbare Aktivität aus Apoptose-Induktion, Zellzyklus-Arretierung, Zelldifferenzierung, Inhibition des Zellstoffwechsels und Inhibition oder Aktivierung der Expression von Genen ausgewählt wird.

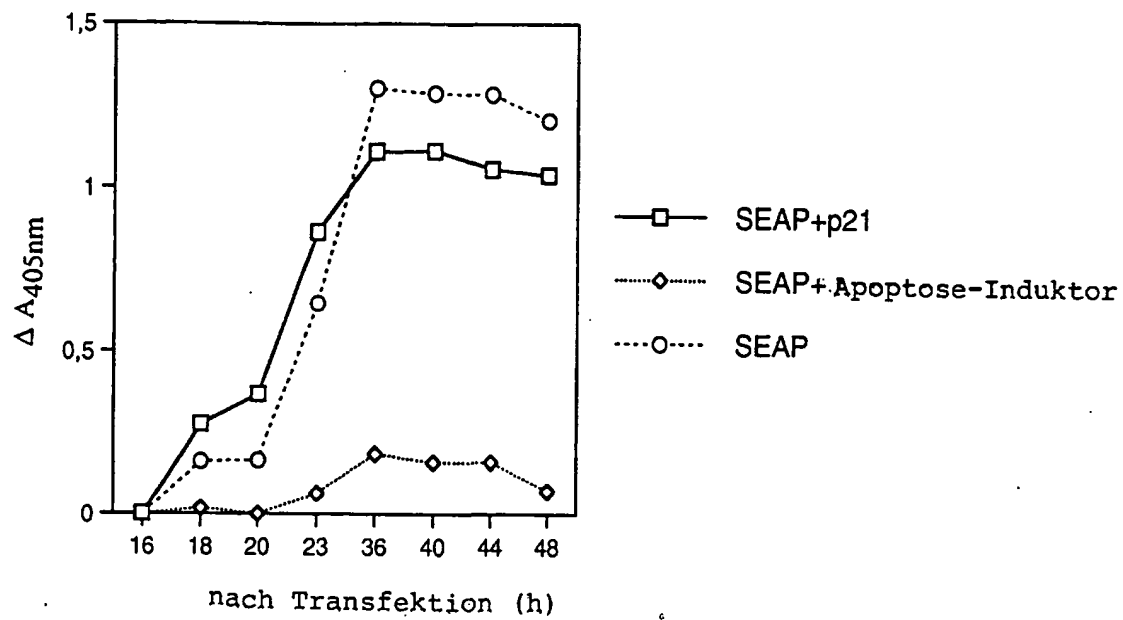
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als nicht-selektionierbare Aktivität die Apoptose-Induktion ausgewählt wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man eine normalisierte DNA-Bibliothek bereitstellt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man bakterielle Wirtszellen, insbesondere E.coli-Wirtszellen verwendet.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Expressionsvektor ein Plasmid verwendet.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (b) eine Kultivierung von einzelnen Wirtszellen umfaßt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (c) eine alkalische Lyse der Wirtszellen umfaßt.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA nach der alkalischen Lyse ohne Zugabe chaotroper Substanzen an eine Adsorptionsmatrix, insbesondere eine Silika-Adsorptionsmatrix, gebunden wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man als Zielzellen gegebenenfalls genetisch manipulierte eukaryontische Zellen, insbesondere Säugerzellen, verwendet.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Transfektion oder Cotransfektion in Schritt (d) durch Calciumphosphat-Copräzipitation, Lipofektion, Elektroporation, Partikelbeschuß oder virale Infektion erfolgt.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (d) eine transiente Cotransfektion des Expressionsvektors und des Reportervektors umfaßt.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Reportervektor eine für ein nachweisbares Genprodukt kodierende Nukleinsäuresequenz in exprimierbarer Form enthält.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das nachweisbare Genprodukt aus sezernierten Enzymen ausgewählt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man die sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) verwendet.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Aktivität des Reportervektors eine Aktivitätsbestimmung des sezernierten Enzyms im Kulturüberstand umfaßt.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man chromogene oder fluoreszierende Enzymsubstrate verwendet.
19. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das nachweisbare Genprodukt aus intrazellulär nachweisbaren Polypeptiden ausgewählt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 14 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß das nachweisbare Genprodukt aus Fluoreszenzproteinen ausgewählt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das nachweisbare Genprodukt aus membranständigen nachweisbaren Polypeptiden ausgewählt wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzliche Parameter der Zielzellen analysiert werden.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß Bestimmung der Aktivität des Reportervektors und gegebenenfalls zusätzlicher Parameter durch Fluoreszenzcytometrie erfolgt.
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aktivität des Reportervektors an mindestens zwei Zeitpunkten nach der Transfektion oder Cotransfektion bestimmt, wobei der erste Zeitpunkt so gewählt wird, daß eine Expression der auf dem Expressionsvektor enthaltenen Nukleinsäuresequenz keinen Einfluß auf die Aktivität des Reportervektors hat und wobei der zweite Zeitpunkt so gewählt wird, daß eine Expression der auf dem Expressionsvektor enthaltenen Nukleinsäuresequenz bereits einen meßbaren Einfluß auf die Aktivität des Reportervektors haben kann.
25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchführung zumindest teilweise automatisiert wird.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte (b) bis (e) an mindestens 50 Proben jeweils parallel durchgeführt werden.
27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin umfassend die Verwendung der identifizierten Gene zur Bereitstellung diagnostischer und therapeutischer Mittel.
28. Verwendung von sezernierten Enzymen als Reportersystem für Apoptose-Prozesse.
29. Verwendung nach Anspruch 28 als Reportersystem zur Identifizierung von Apoptose-assoziierten Genen.
30. Verwendung nach Anspruch 29 als Reportersystem zur Identifizierung von Apoptose-Induktions- oder Apoptose-Inhibitions genen.
31. Verwendung nach Anspruch 28 als Reportersystem zur Identifizierung von die Apoptose beeinflussenden Arzneimitteln.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP) als Reportersystem eingesetzt wird.
33. Verwendung von sezernierten Enzymen als Reportersystem in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27.
34. Vorrichtung zur automatisierten Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 27 umfassend
- (a) Mittel zur Kultivierung einer Vielzahl von Wirtszellen,
  - (b) Mittel zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus einer Vielzahl von Wirtszellen,
  - (c) Mittel zur Transfektion und Kultivierung einer Vielzahl von Zielzellen und
  - (d) Mittel zur Bestimmung der Aktivität eines Reportervektors in den Zielzellen.
35. Vorrichtung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Roboter für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus den Wirtszellen und einen Roboter für die Transfektion von Zielzellen enthält.

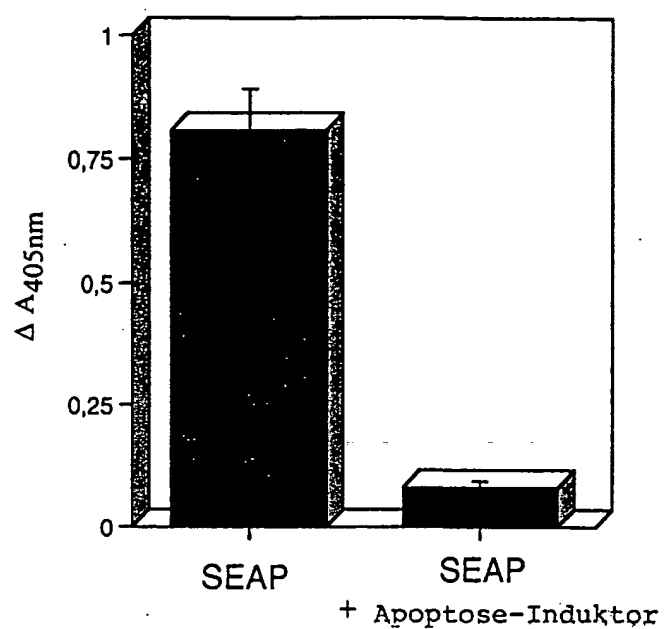


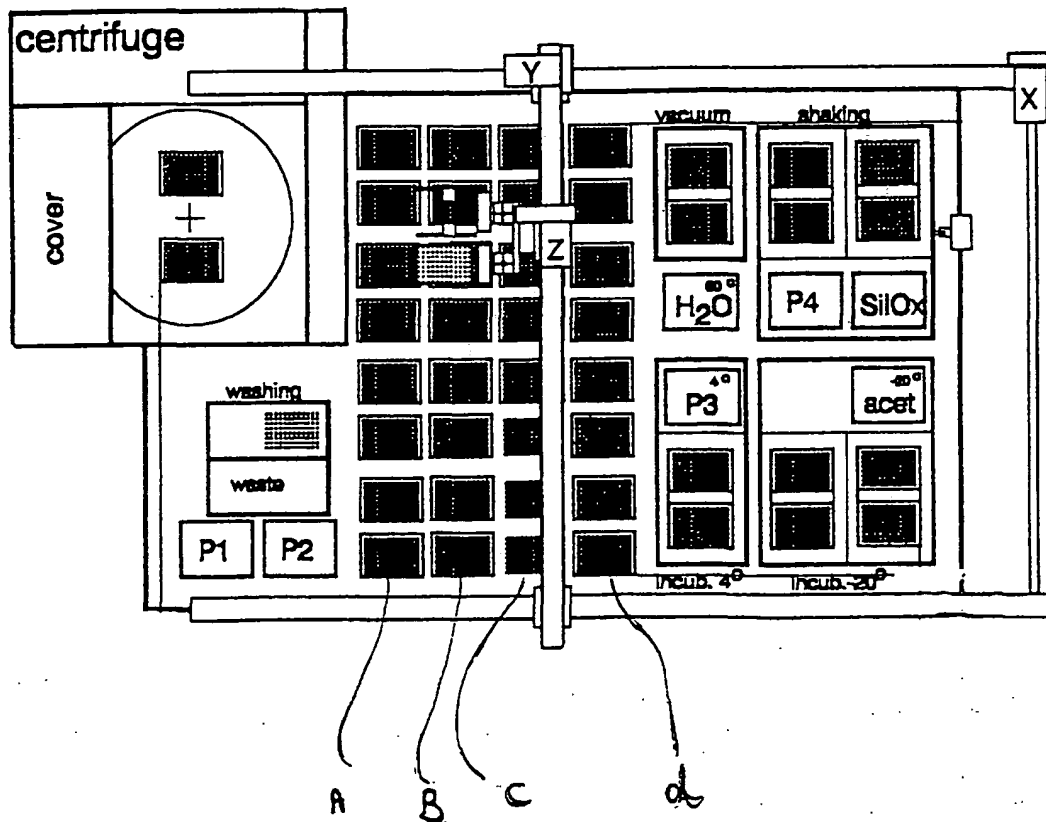
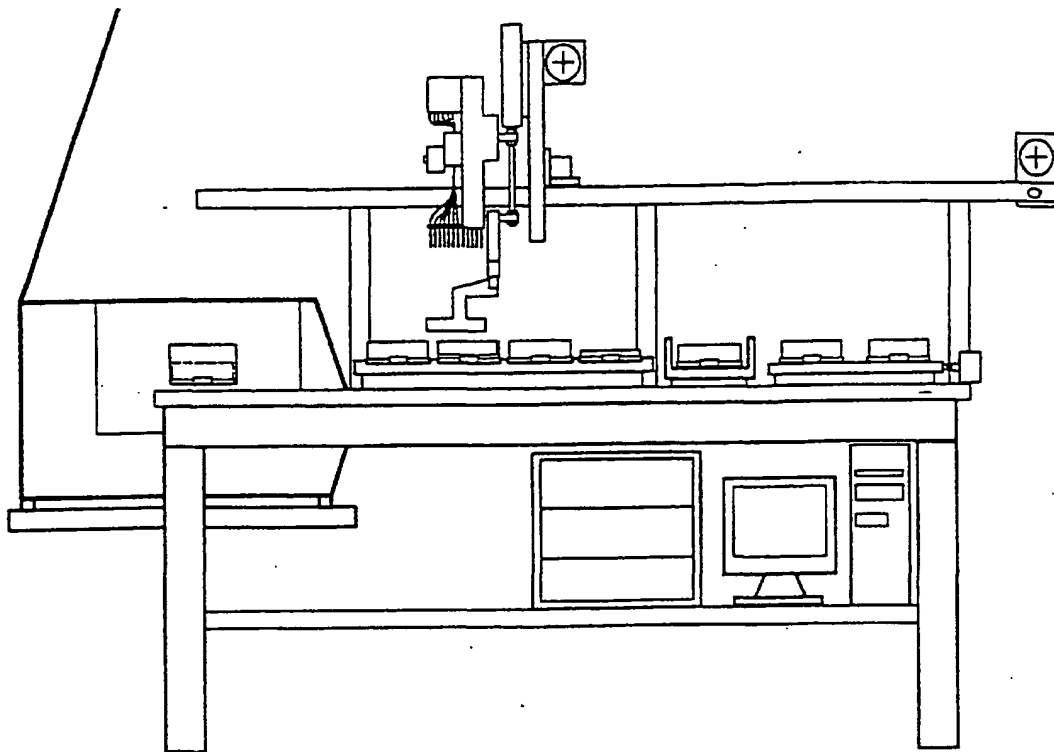
Normalisierte nichtamplifizierte Bibliothek

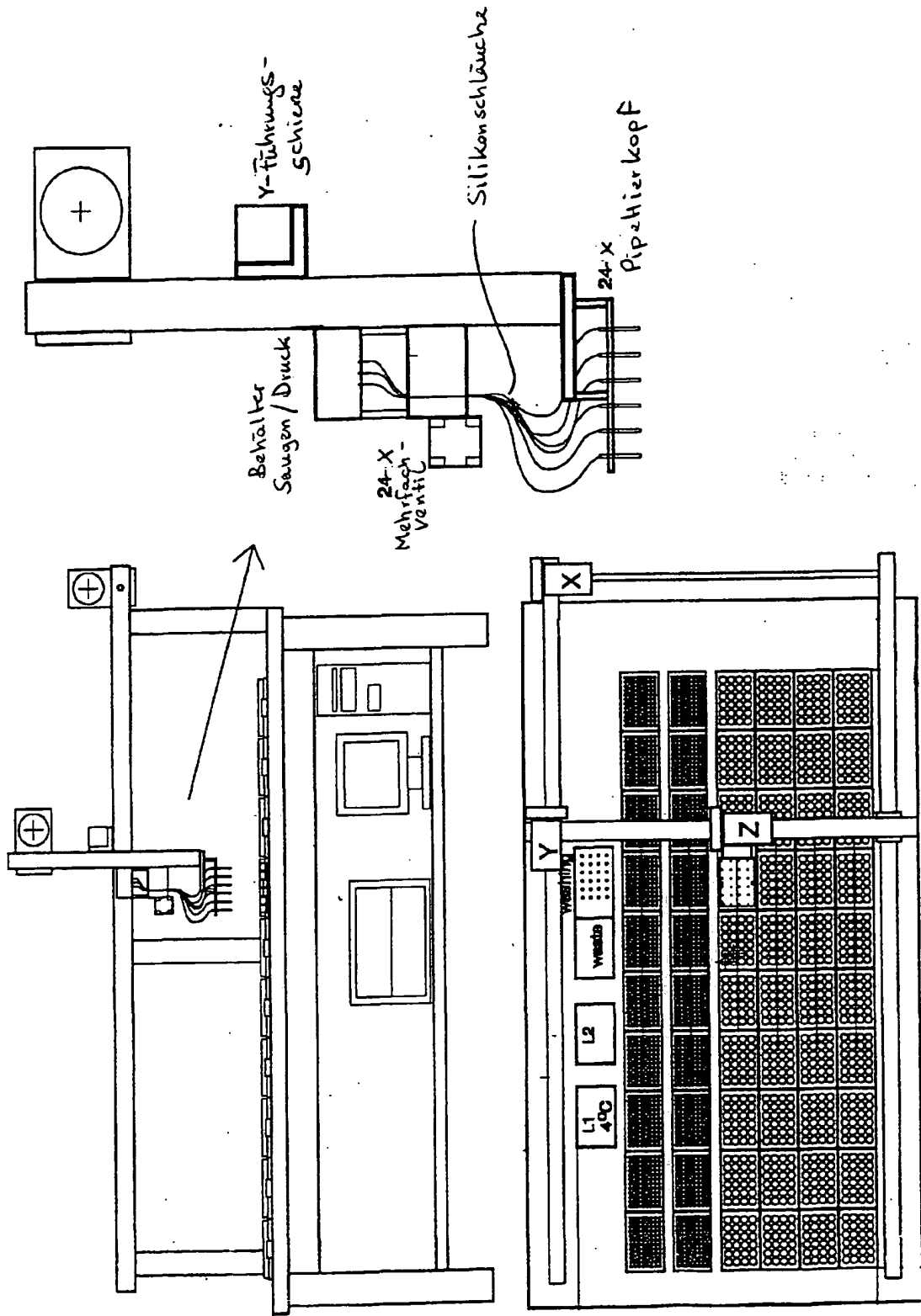








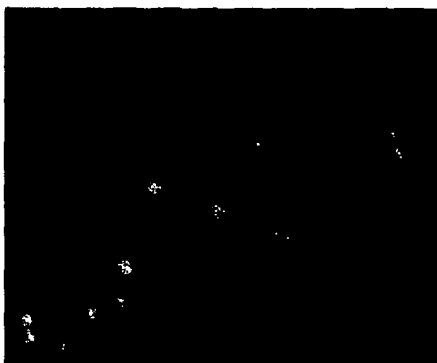




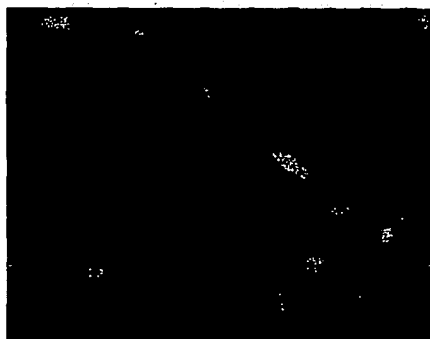
Figur 5

Figur 6

**ANT-1 + GFP**



**Vektor + GFP**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**